

分離大豆たん白質のラット血清 コレステロール濃度低下作用(Ⅳ)

HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECT OF SOY PROTEIN
ISOLATE IN RATS

菅野道廣・石脇尚武・中島克子(九州大学農学部)

Michihiro SUGANO, Naomu ISHIWAKI and Katsuko NAKASHIMA
Kyushu University School of Agriculture, Fukuoka 812

ABSTRACT

The effects of dietary proteins with different arginine/lysine ratios on serum cholesterol levels and hormonal status were studied in male rats fed cholesterol-free semipurified diets for 4 weeks. The dietary proteins examined were casein, pollack protein, sardine protein, egg yolk protein, soybean protein, rice protein and peanut protein. The antihypercholesterolemic effect of vegetable proteins compared to animal proteins was certified. There was a negative correlation ($\gamma = -0.74$) between the serum cholesterol level and the arginine/lysine ratio of dietary protein, indicating a crucial role of this ratio to determine the serum cholesterol level. In general, the fasting level of circulating insulin was lower whereas that of glucagon was higher on feeding vegetable proteins, thus resulting in a reduction of the insulin/glucagon ratio. Changes in the hormonal status may be relevant to the cholesterol-lowering action of the vegetable protein.

分離大豆たん白質はカゼインに比べ、コレステロール(CHOL)代謝を亢進することによって血清CHOL濃度低下作用あるいはCHOL上昇抑制作用を発揮することが、各種動物実験により証明されている^{1,2)}。食餌たん白質の違いによるCHOL代謝の変動機構に関して、アミノ酸組成の差異に原因を求めるいくつかの報告がある³⁻⁵⁾。とりわけ、Kritchevsky^{6,7)}によるArg/Lys比の仮説が最も興味深い。しかしながら、大豆たん白質あるいはカゼインにそれぞれLysあるいはArgを添加してArg/Lys比を変えてみても、必ずしも一致した応答はえられていない^{8,9)}。一方、異なるArg/Lys比を持つ種々の食餌たん白質源を用いた飼育実験では、例数はきわめて限られるが、この比と血漿CHOLレベルの間に負の直線的相関のあることが示されている。

本研究では食餌たん白質のArg/Lys比が血清

CHOL濃度に及ぼす影響を、特にホルモン(インスリンおよびグルカゴン)状態に注目して検討した。

実験方法

初体重125gのWistar系雄ラットを用い、実験食を4週間自由摂取させた。

基本飼料は重量%でたん白質20、コーン油1、塩混合4、水溶性ビタミン1、塩化コリン0.15、セルロース粉末2を含み、ショ糖で100とした^{13,14)}。たん白質源として、実験Ⅰではカゼイン(vitamin-free, ICN Pharmaceuticals)、分離大豆たん白質(フジプロR、不二製油㈱)、米たん白質(脱脂後等電点沈殿により調製¹⁵⁾)およびタラたん白質(マリンビーフ、新潟鉄工所㈱)を、実験Ⅱではカゼイン、大豆たん白質、米たん白質(米たん白質粉を脱脂後調製、島田化学工業㈱)、イワシたん白質(マリンビーフ、新潟鉄工所

Table 1. Protein contents and arginine/lysine ratios of dietary proteins

Protein sources	Protein content (%)	Arginine/lysine ratio
Casein	90.6	0.48
Pollack	91.8	0.70
Sardine	90.4	0.72
Egg yolk	90.0	0.96
Soybean	90.0	1.07
Rice	90.0	2.75
Peanut	88.0	3.94

Protein conversion factor : 6.25 for casein, fish proteins, egg yolk protein and soybean protein ; 5.95 for rice protein and 5.46 for peanut protein.

Table 2. Effects of dietary proteins on concentrations of serum lipids¹

Dietary proteins	Cholesterol (mg/100 ml)	Triglyceride (mg/100 ml)	Phospholipid (mg/100 ml)	Lipoperoxide (nmol/ml)
Experiment I.				
Casein	123 ± 4 ^a	140 ± 20	192 ± 14 ^a	2.08 ± 0.30
Pollack	123 ± 7 ^a	153 ± 18	181 ± 11 ^{a,c}	2.09 ± 0.24
Soybean	90.7 ± 5.7 ^b	134 ± 11	145 ± 10 ^{b,c}	1.85 ± 0.13
Rice	78.0 ± 2.2 ^b	132 ± 13	140 ± 20 ^b	1.56 ± 0.13
Experiment II.				
Casein	95.6 ± 5.4 ^a	154 ± 8 ^a	ND ²	ND
Sardine	92.8 ± 4.5 ^{a,c}	164 ± 6 ^a	ND	ND
Egg yolk	86.5 ± 4.6 ^{a,c}	156 ± 11 ^a	ND	ND
Soybean	72.5 ± 3.4 ^{b,d}	143 ± 10 ^{a,c}	ND	ND
Rice	82.6 ± 3.3 ^{b,c}	123 ± 6 ^{b,c}	ND	ND
Peanut	66.3 ± 4.8 ^d	120 ± 6 ^{b,c}	ND	ND

1: Mean ± SE for 7 (Exp. I) or 8 (Exp. II) rats.

2: Not determined.

Values bearing different letters are significantly different at $p < 0.05$.

(株), 卵黄たん白質(脱脂製品, 太陽化学(株))およびピーナッツたん白質(ピーナッツミールを脱脂後, 等電点沈殿により調製)を用いた。これら食餌たん白質のたん白質含量および Arg/Lys 比は Table 1 に示す。

一夜絶食後, 実験 I では断頭屠殺により, 実験 II ではバルビタール麻酔下 (5 mg/100 g 体重) で下大静脈より採血した。血漿グルカゴンはラジオイムノアッセイ (30K-抗体, 大塚アッセイ研究所, 徳島) によって, また血清インスリンはエンザイムイムノアッセイ (インスリン三井 IR-1100, カイノス(株)) によって測定

した。血清および肝臓の脂質成分ならびに血清グルコースは常法により測定した^{13,14)}。飼育期間終了直前の2日間糞を集め, 凍結乾燥後, 中性および酸性ステロイドを分析した¹⁵⁾。

結 果

摂食量および体重増加量はそれぞれ平均20.9 g/日および162 g/4週でピーナッツ群以外ではほぼ同じであった。ピーナッツ群では摂食量16.9 g/日, 体重増加量117 g/4週とかなり低かった。肝臓重量も各食餌た

Table 3. Effects of dietary proteins on concentrations of liver lipids¹

Dietary proteins	Cholesterol (mg/g)	Triglyceride (mg/g)	Phospholipid (mg/g)
Experiment I			
Casein	3.32±0.10 ^a	19.3±0.8	40.1±0.7
Pollack	3.30±0.06 ^a	16.3±1.3	39.5±0.8
Soybean	3.15±0.07 ^{a,b}	16.4±0.8	40.0±0.5
Rice	3.01±0.08 ^b	17.5±1.1	41.9±1.3
Experiment II			
Changes	3.44±0.17	13.3±1.2	38.9±0.6
Sardine	3.09±0.07	14.5±1.1	39.2±0.5
Egg yolk	3.33±0.21	11.3±0.7	35.7±0.8
Soybean	2.96±0.06	12.3±0.8	39.7±0.4
Rice	3.19±0.11	14.5±1.5	39.0±0.4
Peanut	3.66±0.31	12.6±1.7	38.5±0.6

1: Mean±SE for 7 (Exp. I) or 8 (Exp. II) rats.

Values bearing different letters are significantly different at $p<0.05$.

Table 4. Effects of dietary proteins on fecal excretion of steroids

Dietary proteins	Stool weight (g/day) ²	Neutral steroids (mg/day)	Acidic steroids (mg/day)
Experiment I			
Casein	0.88±0.04	4.30±0.23 ^a	5.43±0.77 ^a
Pollack	0.92±0.03	6.42±0.22 ^b	2.73±0.35 ^b
Soybean	0.93±0.05	6.25±0.36 ^b	6.27±0.60 ^a
Rice	0.91±0.04	8.49±0.54 ^c	6.47±0.98 ^a
Experiment II			
Casein	0.72±0.02 ^a	4.10±0.20 ^a	3.87±0.55 ^a
Sardine	0.87±0.03 ^a	5.89±0.30 ^{b,c}	4.98±0.81 ^a
Egg yolk	1.16±0.08 ^b	4.72±0.11 ^{a,c}	3.65±0.37 ^a
Soybean	1.13±0.11 ^b	8.48±0.71 ^d	7.84±1.45 ^b
Rice	0.82±0.06 ^a	5.01±0.45 ^{b,c}	5.06±0.53 ^a
Peanut	1.30±0.07 ^b	4.17±0.49 ^a	4.16±0.67 ^a

1: Mean±SE for 7 (Exp. I) or 8 (Exp. II) rats.

2: Dry weight.

Values bearing different letters are significantly different at $p<0.05$.

ん白質群間で同じであり、一般に植物性たん白質摂取ラットで動物性たん白質摂取より低い傾向にあった(それぞれ3.02および3.21g/100g体重)が、魚たん白質摂取ラットでは植物性たん白質群と同程度であった。

Table 2 に血清脂質濃度を示す。植物性たん白質のCHOL 上昇抑制作用は明らかであった。植物性たん白質摂取はトリグリセリド (TG) およびリン脂質 (PL) 濃度も低下させた。血清過酸化脂質濃度 (チオバルビ

ツール酸反応性物質として定量¹⁷⁾) もこれまでの観察同様^{13,14)}、植物性たん白質食で動物性たん白質食より低値の傾向にあった。血清 CHOL 濃度と食餌たん白質の Arg/Lys の間には有意な負の相関があることが観察された ($r=-0.74$, $p<0.05$)。

肝臓脂質濃度を Table 3 に示す。肝臓 CHOL 濃度は魚たん白質およびピーナッツたん白質を除いて植物性たん白質群で動物性たん白質群よりやや低かった。

魚たん白質の CHOL 濃度は両実験で大きく異なっていた。一方、ピーナッツたん白質はかなり高い CHOL 値を示した。肝臓 TG および PL 濃度には食餌たん白質の違いによる差異は認められなかった。

糞中への中性および酸性ステロイド排泄は一般に植物性たん白質群で動物性たん白質群より高い傾向にあったが (Table 4), 魚とピーナッツたん白質は例外であった。魚たん白質の中性ステロイド排泄は植物性たん白質のそれと同程度であったけれども, 酸性ステロイド排泄には一定した応答は認められなかった。このような変化にもかかわらず, 全ステロイド排泄はカゼイン摂取ラットとほぼ同じであった。ピーナッツたん白質摂取ラットの糞中へのステロイド排泄はかなり低かった。中性ステロイドの約 80% はコプロスタノールであったが, CHOL からコプロスタノールへの転換の程度には群間で差は認められなかった。糞中の酸性ステロイドの組成には食餌たん白質のタイプによる一定の変化は観察されなかった。

絶食時の血清インスリン, 血漿グルカゴンおよび血清グルコースレベルを Table 5 に示す。血清グルコース濃度は植物性たん白質摂取で明らかに低下した。血清インスリンレベルは植物性たん白質群で低い傾向にあったが, 血漿グルカゴンレベルは逆に高いようであった。従って, インスリン/グルカゴン比は動物性たん白質群で高い傾向にあり, 植物性たん白質と動物性たん白質をそれぞれ 1 つのグループにして比較するとこの比は有意に上昇した。

考 察

本研究は植物性たん白質の CHOL 上昇抑制作用を

引き起す決定因子の 1 つとして Arg/Lys 比の重要性を証明した。得られた結果は, Balogun ら¹²⁾ が異なった Arg/Lys 比をもつ種々の食餌たん白質 (African locust meal, groundnut meal, water melon およびカゼインで, Arg/Lys 比はそれぞれ 1:0.0, 3.15, 2.49 および 0.52) のラット血清 CHOL 濃度に及ぼす影響を比較検討した結果と一致した (食餌たん白質の Arg/Lys 比と血清 CHOL レベルの間の相関は $r = -0.73$)。大豆たん白質に Lys を, カゼインに Arg を添加して Arg/Lys 比を変えたわれわれの先の実験⁹⁾ では, Arg/Lys 比の変化はラット血清 CHOL レベルに明確な影響を及ぼさなかった。同様のことがウサギを用いた実験においても観察されている^{7,8)}。たん白質に添加した遊離アミノ酸は消化管内ではたん白質そのものとはかなり異なった挙動を示す。そのため, 食餌たん白質の CHOL 低下作用にはたん白質のアミノ酸組成よりもむしろアミノ酸配列が関係しているかもしれない。Arg や Lys 以外のアミノ酸の違いも考慮する必要がある⁴⁾。

Noseda ら^{21,22)} は大豆たん白質の降 CHOL 作用にグルカゴンが重要な役割を果している可能性を指摘している。血中インスリンおよびグルカゴンレベルに食餌たん白質の Arg/Lys 比が影響を及ぼすことが認められた (Table 5)。Arg/Lys 比が高い植物性たん白質摂取ラットではインスリンレベルが低く, グルカゴンレベルが高い傾向にあった。その結果, インスリン/グルカゴン比は植物性たん白質摂取ラットで低下した。血清グルコースレベルの応答はこれらホルモンの応答と対応している。絶食していないラットから採血した場合, 血清インスリンレベルは大豆たん白質摂取でカ

Table 5. Effects of dietary proteins on concentrations of serum glucose, insulin and glucagon

Dietary proteins	Serum glucose (mg/100 ml)	Serum insulin (μ U/ml)	Plasma glucagon (pg/ml)	Insulin/glucagon ratio
Experiment II				
Casein	140 $\pm$ 11 ^a	19.6 $\pm$ 2.1	24.1 $\pm$ 2.2	0.81 $\pm$ 0.11 ^a
Sardine	136 $\pm$ 6 ^a	20.4 $\pm$ 3.5	24.6 $\pm$ 2.4	0.85 $\pm$ 0.12 ^a
Egg yolk	135 $\pm$ 12 ^{a,c}	17.3 $\pm$ 2.5	32.0 $\pm$ 4.1	0.54 $\pm$ 0.05 ^{b,c}
Soybean	116 $\pm$ 6 ^{a,c}	18.8 $\pm$ 2.9	32.6 $\pm$ 5.1	0.66 $\pm$ 0.15 ^{a,c}
Rice	111 $\pm$ 7 ^{b,c}	14.2 $\pm$ 1.8	36.1 $\pm$ 3.7	0.43 $\pm$ 0.07 ^{b,c}
Peanut	106 $\pm$ 8 ^b	10.7 $\pm$ 1.5	31.9 $\pm$ 4.4	0.36 $\pm$ 0.05 ^b

1: Mean $\pm$ SE for 8 rats.

Values bearing different letters are significantly different at $p < 0.05$.

ゼイン摂取より低かった⁹⁾。遊離アミノ酸のホルモンレベルに及ぼす効果は多量投与の時のみに明確であった⁹⁾。インスリンとグルカゴンは脂質代謝に相反する機能を有しているので、ホルモン状態の変動がたん白質の作用に影響を及ぼしている可能性がある。本実験では膵臓起源のグルカゴン (30K-抗体) のみを測定したので、中間代謝調節を効果的に行っているかもしれない消化管グルカゴンのレベルにも注意する必要がある²³⁾。Nosedal²²⁾は高CHOL血症患者に大豆たん白質を摂取させた結果、低分子量グルカゴンの増加を観察している。

これまでの結果同様^{13,14)}、糞中へのステロイド排泄は一般に植物性たん白質摂取群で動物性たん白質摂取群より増加したが、いくらかの例外があった。ステロイド排泄の促進は植物性たん白質の降CHOL作用を引き起す直接の原因とみなされる^{1,2)}。しかしながら、食餌たん白質により小腸からのステロイドの吸収が特異的に変動する機構については明らかでない。最近、Story & Kritchevsky²⁴⁾はカゼインへのArg添加および大豆たん白質へのLys添加は糞中ステロイド排泄を増減させることをウサギで観察した。一方、Gibney²⁵⁾はこのような応答をまったく認めていない。

以上の結果より、食餌たん白質のArg/Lys比が血清CHOL濃度の重要な調節因子であるかもしれない。ホルモン (インスリン、グルカゴン) 状態の変動が植物性たん白質のCHOL上昇抑制作用に関与している可能性がある。

要 約

1. 食餌たん白質源として牛乳、魚、卵黄、大豆、米およびピーナッツから調製したたん白質をラットに与え、血清脂質およびホルモンレベルに及ぼす影響を検討した。
2. 植物性たん白質は動物性たん白質に比べCHOL上昇抑制作用を示すことが確認された。
3. 血清CHOLレベルと食餌たん白質のArg/Lys比の間には負の相関が認められ、この比が血清CHOLレベルを決定する重要な因子であることが示唆された。
4. 一般に一夜絶食時の血中インスリンレベルは植物性たん白質摂取で低く、逆にグルカゴンレベルは高く、その結果インスリン/グルカゴン比は低下した。ホルモン状態の変動がたん白質のコレステロール代謝への作用に関連しているようである。

文 献

- 1) Huff, M.W., and Carroll, K.K. (1980): Effects of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits. *J. Lipid Res.*, **21**, 546-558.
- 2) Nagata, Y., Ishiwaki, N., and Sugano, M. (1982): Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixture in relation to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, **112**, 1614-1625.
- 3) Liepa, G.U., and Park, M. (1981): Role of oilseed protein in lipoprotein metabolism. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 608A.
- 4) Katan, M.B., Vroomen, L.H.M., and Herums, R.J.J. (1982): Reduction of casein-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in rabbits and rats by dietary glycine, arginine and alanine. *Atherosclerosis*, **43**, 381-391.
- 5) Sugano, M. (1983): Hypocholesterolemic effect of plant protein in relation to animal protein: Mechanism of action. In "Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis", ed. by Gibney, M.J., and Kritchevsky, D., Alan R. Liss Inc., New York, pp. 51-84.
- 6) Kritchevsky, D. (1979): Vegetable protein and atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 135-140.
- 7) Szarnicki, S., and Kritchevsky, D. (1979): The effect of dietary proteins on lipoprotein metabolism. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 388A.
- 8) Huff, M.W., and Carroll, K.K. (1980): Effects of dietary proteins and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits. *J. Nutr.*, **110**, 1676-1685.
- 9) Sugano, M., Ishiwaki, N., Nagata, Y., and Imaizumi, K. (1982): Effects of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats. *Brit. J. Nutr.*, **48**, 211-221.
- 10) Eklund, A., and Sjöblom, L. (1980): Effects of the source of dietary protein on serum low density lipoproteins (VLDL+LDL) and tocopherol levels in female rats. *J. Nutr.*, **110**, 2321-2335.
- 11) Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Czarnecki, S.K., and Klurfeld, D.M. (1982): Atherogenicity of

- animal and vegetable protein. Influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis*, **41**, 429-431.
- 12) Balogun, E.A., Balogun, O.O., and Odutuga, A. A. (1982): Arginine: lysine ratio as a contributory factor to the hypocholesterolemic effect of plant protein sources. *Ircs Med.Sci.*, **10**, 643-644.
 - 13) Nagata, Y., Imaizumi, K., and Sugano, M. (1980): Effects of soya-bean protein and casein on serum cholesterol levels in rats. *Brit. J. Nutr.*, **44**, 113-121.
 - 14) Nagata, Y., Tanaka, K., and Sugano, M. (1981): Further studies on the hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in rats. *Brit. J. Nutr.*, **45**, 233-241.
 - 15) Sawai, H., and Morita, Y. (1968): Studies on rice glutelin. Part. I. Isolation and purification of glutelin from rice endosperm. *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 76-80.
 - 16) Yagi, K. (1976): A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212-216.
 - 17) Sugano, M., Ide, T., Kohno, M., Watanabe, M., Cho., Y.-J., and Nagata, Y. (1983): Biliary and fecal steroid excretion in rats fed partially hydrogenated soybean oil. *Lipids*, **18**, 186-192.
 - 18) Snedecor, G.W., and Cochran, W.G. (1976): Statistical Methods., 6th edition, Iowa State University Press, Ames, pp. 258-298.
 - 19) 菅野道廣, 永田保夫(1980): 分離大豆たん白質のラット血清コレステロール濃度低下作用(I). 大豆たん白質栄養研究会会誌, **1**, 24-30.
 - 20) 菅野道廣, 永田保夫(1981): 分離大豆たん白質のラット血清コレステロール濃度低下作用(II). 大豆たん白質栄養研究会会誌, **2**, 45-51.
 - 21) Nosedá, G., and Fragiácomó, C. (1980): Effects of soybean protein diet on serum lipids, plasma glucagon, and insulin, in "Diets and Drugs in Atherosclerosis", ed. by Nosedá, G., Lewis, B., and Paoletti, R., Raven Press, New York, pp. 61-65.
 - 22) Nosedá, G., Fragiácomó, C., Gatti, E., Descovich, G.C., and Sirtori, C.R. (1983): Glucagon release following experimental diets in man: Effects of soybean and casein enriched diets. *Pharmacol. Res. Commun.*, **14**, 867-878.
 - 23) Sirkant, C.B., McCorkle, K., and Unger, R.M. (1977): Properties of immunoreactive glucagon fractions of canine stomach and pancreas. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1847-1851.
 - 24) Story, J.A., and Kritchevsky, D. (1983): Influence of dietary protein on cholesterol metabolism. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 696.
 - 25) Gibney, M.J. (1983): The effect of dietary lysine to arginine ratio on cholesterol kinetics in rabbits. *Atherosclerosis*, **47**, 263-270.